



## DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIEE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

<p>(51) Classification internationale des brevets 5 :  <b>C12Q 1/68, G01N 1/34</b>  <b>C12N 15/10</b></p>	<p><b>A1</b></p>	<p>(11) Numéro de publication internationale: <b>WO 93/01312</b></p> <p>(43) Date de publication internationale: 21 janvier 1993 (21.01.93)</p>
<p>(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR92/00646</p> <p>(22) Date de dépôt international: 6 juillet 1992 (06.07.92)</p> <p>(30) Données relatives à la priorité:  91/08579 9 juillet 1991 (09.07.91) FR</p> <p>(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): BERTIN &amp; CIE [FR/FR]; B.P. 3, F-78373 Plaisir Cédex (FR).</p> <p>(72) Inventeur; et  (75) Inventeur/Déposant (US seulement) : BOQUET, Jean [FR/FR]; 4, allée du Grand-Amiral, F-78610 Le Perray-en-Yvelines (FR).</p> <p>(74) Mandataire: CABINET ORES; 6, avenue de Messine, F-75008 Paris (FR).</p>		<p>(81) Etats désignés: AU, CA, JP, KR, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IT, LU, MC, NL, SE).</p> <p>Publiée  <i>Avec rapport de recherche internationale.</i>  <i>Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.</i></p>
<p>(54) Title: CARTRIDGE, DEVICE AND METHOD FOR PREPARING PURIFIED NUCLEIC ACIDS FROM A CELL SAMPLE</p> <p>(54) Titre: CARTOUCHE, DISPOSITIF ET PROCEDE DE PREPARATION D'ACIDES NUCLEIQUES PURIFIES, A PARTIR D'UN ECHANTILLON DE CELLULES</p> <p>(57) Abstract</p> <p>A cartridge for preparing nucleic acids such as DNA from cells is disclosed. The cartridge includes two end rings (14) which seal it into a tube (10), two dialysis membranes (16) defining a dialysis enclosure (18) therebetween, and a cell nucleus retaining filter (20) dividing said enclosure (18) into two separate compartments, as well as an assembly (24) for feeding materials into one of said compartments, an assembly (26) for removing the materials from the other compartment, and assemblies (28, 30) for feeding a dialysis liquid into the tube or circulating it therein around the cartridge. A device and a method using said cartridge are also provided.</p>		
<p>(57) Abrégé</p> <p>Cartouche pour la préparation d'acides nucléiques tels que l'ADN à partir de cellules, comprenant deux bagues d'extrémité (14) par lesquelles elle est montée à étanchéité dans un tube (10), deux membranes de dialyse (16) délimitant entre elles une enceinte de dialyse (18), un filtre (20) de rétention des noyaux des cellules partageant ladite enceinte (18) en deux compartiments séparés, et des moyens (24) d'amenée de produits dans l'un de ces compartiments, des moyens (26) d'extraction de produits de l'autre de ces compartiments, et des moyens (28, 30) d'amenée ou de circulation d'un liquide de dialyse dans le tube à l'extérieur de la cartouche. Dispositif et procédé utilisant cette cartouche.</p>		

# **UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION**

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	FI	Finlande	ML	Mali
AU	Australie	FR	France	MN	Mongolie
BB	Barbade	GA	Gabon	MR	Mauritanie
BE	Belgique	GB	Royaume-Uni	MW	Malawi
BF	Burkina Faso	GN	Guinée	NL	Pays-Bas
BG	Bulgarie	GR	Grèce	NO	Norvège
BJ	Bénin	HU	Hongrie	PL	Pologne
BR	Brazil	IE	Irlande	RO	Roumanie
CA	Canada	IT	Italie	RU	Fédération de Russie
CF	République Centrafricaine	JP	Japon	SD	Soudan
CG	Congo	KP	République populaire démocratique de Corée	SE	Suède
CH	Suisse	KR	République de Corée	SN	Sénégal
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SU	Union soviétique
CM	Cameroon	LK	Sri Lanka	TD	Tchad
CS	Tchécoslovaquie	LU	Luxembourg	TC	Togo
DE	Allemagne	MC	Monaco	US	Etats-Unis d'Amérique
DK	Danemark	MG	Madagascar		
ES	Espagne				

CARTOUCHE, DISPOSITIF ET PROCEDE DE PREPARATION D'ACIDES  
NUCLEIQUES PURIFIES, A PARTIR D'UN ECHANTILLON DE  
CELLULES.

L'invention concerne une cartouche pour l'ex-  
traction et la purification d'acides nucléiques, notam-  
ment d'ADN génomique, à partir d'un échantillon de sang,  
de cellules de tissus ou de cellules en culture, ainsi  
qu'un dispositif et un procédé utilisant cette cartouche.

Les procédés classiques d'extraction d'ADN à  
partir de cellules consistent en général en une lyse to-  
tale des cellules, une dégradation enzymatique des pro-  
téines, l'enlèvement des protéines dégradées et de li-  
pides au moyen de phénol et de chloroforme, une précipi-  
tation de l'ADN au moyen d'éthanol, puis une remise en  
suspension de l'ADN extrait.

Pour l'extraction d'ADN à partir du sang de  
mammifères, le traitement comprend une lyse des globules  
rouges et des membranes plasmatiques des globules blancs,  
laissant intacts les noyaux des globules blancs, puis une  
séparation de ces noyaux par centrifugation qui sont en-  
suite traités comme indiqué plus haut.

Dans le cas de tissus solides, les tissus sont  
dilacérés et homogénéisés dans une solution appropriée,  
avant de subir le traitement décrit plus haut.

Ces traitements sont longs et fastidieux et se  
prêtent mal à l'extraction d'ADN génomique à partir d'un  
grand nombre d'échantillons de cellules. Ils nécessitent  
de plus la manipulation de solvants toxiques comme le  
phénol et le chloroforme.

On a déjà proposé des procédés plus simples  
(voir par exemple "Nucleic Acids Research" volume 17,  
n° 20, de 1989, page 8390), consistant pour l'essentiel à  
lyser les cellules, à isoler les noyaux par centrifuga-  
tion, à lyser les noyaux et dégrader les protéines par un  
mélange de PLB et de protéinase K, en évitant l'utilisa-  
tion de solvants tels que le phénol et le chloroforme.

La présente invention a essentiellement pour objet une cartouche pour l'extraction et la purification d'acides nucléiques tels que l'ADN génomique, à partir d'un échantillon de cellules, permettant de simplifier encore l'extraction de l'ADN en supprimant les opérations de séparation par centrifugation utilisées dans la technique antérieure, ainsi que les extractions à l'aide de solvants organiques, la précipitation de l'ADN et sa remise en suspension (étape souvent très longue).

Elle a également pour objet un dispositif et un procédé d'extraction et de purification d'acides nucléiques tels que l'ADN génomique, utilisant cette cartouche.

Elle propose, à cet effet, une cartouche comprenant une enceinte de dialyse destinée en particulier à la purification des acides nucléiques, et des moyens d'entrée et de sortie de produits dans l'enceinte de dialyse, caractérisée en ce qu'elle comprend un support plan allongé de faible épaisseur, à lumière centrale, sur les deux faces duquel sont fixées des membranes de dialyse définissant entre elles l'enceinte de dialyse, et deux bagues d'extrémité, qui sont montées aux extrémités longitudinales opposées dudit support et qui comprennent chacune un conduit traversant débouchant dans l'enceinte de dialyse.

Une telle cartouche est réalisable avec des dimensions permettant de la monter dans un tube standard d'un dispositif classique de traitement d'échantillons biologiques, par exemple du type à carrousel utilisé de façon très répandue dans les laboratoires de biologie.

Avantageusement, la cartouche selon l'invention comprend un filtre de rétention des noyaux des cellules, porté par le support et partageant l'enceinte de dialyse en deux compartiments séparés, dans lesquels les conduits traversants desdites bagues d'extrémité débouchent respectivement d'un côté et de l'autre du filtre.

Le filtre précité est par exemple un film de polyester à pores ou mailles très fines ayant des dimensions de l'ordre du micromètre.

La présence de ce filtre dans l'enceinte de dialyse de la cartouche permet d'éviter les opérations classiques de séparation des noyaux par centrifugation, grâce au fait que les noyaux des cellules sont retenus et se fixent sélectivement sur le filtre lorsqu'on fait circuler les cellules lysées dans l'enceinte de dialyse à travers le filtre.

Dans un mode de réalisation préféré de l'invention, le support précité est formé de deux cadres rectangulaires superposés, chaque cadre comportant, sur la face interne d'un de ses petits côtés, une rainure sensiblement axiale débouchant à ses extrémités dans l'enceinte de dialyse et dans le conduit traversant de la bague d'extrémité correspondante.

Le filtre précité est fixé entre ces deux cadres superposés, de sorte que les conduits traversants des bagues d'extrémité débouchent l'un d'un côté du filtre, et l'autre de l'autre côté du filtre.

Selon une autre caractéristique de l'invention, chaque bague comprend, sur une de ses faces d'extrémité, une rainure transversale destinée à recevoir un petit côté d'un cadre précité et dans laquelle le conduit traversant de la bague débouche en regard de la rainure axiale formée dans ce petit côté du cadre.

L'autre face d'extrémité de la bague comprend un septum ou une cavité cylindrique de réception d'un disque de matière élastomère à perçage axial de faible diamètre auto-obturant. Le conduit traversant de la bague est formé à travers le fond de cette cavité.

L'invention propose également un dispositif pour l'extraction et la purification d'acides nucléiques à partir d'un échantillon de cellules, au moyen d'une cartouche du type précité, caractérisé en ce qu'il com-

prend au moins un tube dans lequel ladite cartouche est montée à étanchéité par ses bagues d'extrémité, des moyens d'amenée ou de circulation d'un liquide de dialyse dans le tube à l'extérieur de la cartouche, des moyens de liaison reliant les conduits traversants des bagues d'extrémité sélectivement à des moyens d'extraction par soufflage et/ou aspiration et à des moyens d'amenée d'échantillon à traiter, de réactifs et de produits de rinçage.

10 L'extraction et la purification d'acides nucléiques, en particulier d'ADN peuvent être réalisées entièrement dans la cartouche placée dans un tube du dispositif, sans qu'il soit nécessaire de retirer ce tube ou cette cartouche du dispositif par exemple pour des opérations de séparation par centrifugation.

Avantageusement, ladite cartouche est disposée dans le tube entre deux pièces semi-cylindriques permettant de réduire le volume interne libre du tube et comportant des conduits de passage de liquide de dialyse.

20 De par sa structure, la cartouche a un coût faible et peut donc être jetée après usage, ce qui évite tout risque de contamination ou de pollution d'un échantillon à l'autre.

L'invention propose également un procédé de 25 préparation d'acides nucléiques purifiés à partir d'un échantillon de cellules, par lyse des noyaux des cellules, dégradation des protéines et purification des acides nucléiques par dialyse, caractérisé en ce qu'il comprend essentiellement :

- 30 - une étape de séparation et de fixation des noyaux sur un filtre placé dans une enceinte de dialyse,  
- une étape de lyse in situ des noyaux fixés sur le filtre, incluant une dégradation des protéines et des acides nucléiques indésirables,

- et une étape finale de dialyse in situ pour éliminer de ladite enceinte les constituants autres que les acides nucléiques recherchés.

Avantageusement, ce procédé comporte également  
5 une étape préalable de lyse in situ des cellules dans l'enceinte de dialyse.

En outre, la fixation des noyaux sur le filtre précité dans l'enceinte de dialyse permet de soumettre ces noyaux à des rinçages successifs par des tampons appropriés pour l'élimination de lipides, de ribosomes qui  
10 seraient restés attachés à l'enveloppe des noyaux ou encore de molécules internes aux noyaux autres que les acides nucléiques à purifier.

De façon évidente, un tel procédé est mis en  
15 oeuvre dans la cartouche selon l'invention, sans manipulation de cette cartouche entre deux étapes de procédé.

L'invention sera mieux comprise et d'autres caractéristiques, détails et avantages de celle-ci apparaîtront plus clairement à la lecture de la description  
20 qui suit, faite à titre d'exemple en référence aux dessins annexés, dans lesquels :

- la figure 1 illustre schématiquement le principe de l'invention;

- la figure 2 est une vue éclatée des différents constituants d'une cartouche d'extraction selon  
25 l'invention;

- la figure 3 est une vue en élévation d'un cadre de support de membrane et de filtre,

- la figure 4 est une vue de dessus d'une  
30 pièce semi-cylindrique de réduction de volume;

- la figure 5 est une vue schématique partielle à plus grande échelle, en coupe axiale, d'une cartouche d'extraction;

- la figure 6 illustre schématiquement les  
35 opérations essentielles du procédé d'extraction d'ADN selon l'invention.

On se réfère d'abord à la figure 1, qui illustre schématiquement le principe de l'invention.

Dans cette figure, 1- référence 10 désigne un tube cylindrique ouvert à ses deux extrémités, dans lequel est montée à étanchéité une cartouche 12 selon l'invention, comprenant deux bagues d'extrémité 14 entre lesquelles sont prévues deux membranes de dialyse 16 délimitant entre elles une enceinte de dialyse 18 fermée, et un filtre 20 qui partage l'enceinte de dialyse 18 en deux compartiments séparés 22 et 24. La bague supérieure 14 comprend un conduit 26 d'amenée d'échantillon et de produits à l'intérieur de l'enceinte de dialyse, dans le compartiment 22, et la bague inférieure 14 comprend un conduit 26 de sortie de produits qui débouche dans l'autre compartiment 24 de l'enceinte de dialyse. Enfin, le tube 10 comprend des conduits 28, 30 d'amenée et de sortie respectivement d'un liquide de dialyse, qui débouchent dans le tube à l'extérieur de l'enceinte de dialyse 18 délimitée par les membranes 16.

Le principe est le suivant :

un échantillon à traiter, par exemple de sang, est amené avec un produit classique de lyse ménagée des cellules dans l'enceinte de dialyse 18 par le conduit 24 de la bague supérieure 14, et sort ensuite de cette enceinte de dialyse 18 par le conduit 26 de la bague inférieure 14, après avoir traversé le filtre 20. Celui-ci est constitué par exemple d'un film de polyester de faible épaisseur, de l'ordre du micromètre par exemple, présentant des mailles très fines ayant des dimensions de l'ordre du micromètre, qui retiennent et fixent les noyaux des cellules lysées.

Après rinçage par circulation d'un ou de plusieurs tampons appropriés dans l'enceinte 18, on réalise dans cette enceinte la lyse des noyaux fixés sur le filtre 20, on dégrade les ARNs par exemple au moyen de RNases et on dégrade les protéines par exemple au moyen



de la protéinase K, on purifie l'ADN présent dans l'enceinte 18 par dialyse dans le tube 10, et on extrait ensuite l'ADN de l'enceinte 18 par exemple par soufflage d'air par le conduit 24 et/ou aspiration par le conduit 26.

On se réfère maintenant aux figures 2 à 5, qui représentent un mode de réalisation préféré de la cartouche selon l'invention.

Cette cartouche comprend, comme déjà indiqué, deux bagues d'extrémité 14, et deux membranes de dialyse 16 fixées sur un support-plan de faible épaisseur qui porte également le filtre 20. Le support des membranes 16 et du filtre 20 est constitué de deux cadres rectangulaires 32 identiques superposés, dont l'un est représenté à plus grande échelle et en élévation en figure 3. Chaque cadre 32 est réalisé en une matière synthétique ou une matière composite à base de fibre de verre et comprend deux grands côtés longitudinaux 34 reliés entre eux par deux petits côtés transversaux 36, de façon à délimiter une lumière centrale 38 de forme allongée. L'un des petits côtés 36 du cadre 32 comprend, sur sa face interne ou face sur laquelle est appliqué l'autre cadre 32, une rainure sensiblement axiale 40 dont les extrémités débouchent à l'extérieur du cadre et dans la lumière 38, respectivement. Sur l'autre face du cadre 32, ou face destinée à recevoir une membrane 16, les bords de la lumière 38 sont chanfreinés comme indiqué en 42 en pointillé sur la figure 3.

Les deux cadres 32 sont superposés en étant disposés tête-bêche, le filtre 20 étant fixé par collage à sa périphérie sur la face interne d'un des cadres, l'autre cadre étant ensuite collé sur le premier de telle sorte que leurs lumières 38 soient alignées, tout en étant séparées l'une de l'autre par le filtre 20. Les membranes de dialyse 16 sont ensuite collées à leur périphérie sur les faces externes des cadres 32.

Le petit côté transversal 36 des cadres 32, qui comporte la rainure précitée 40, a une largeur supérieure à celle de l'autre petit côté 36 de ces cadres, de sorte que, dans la configuration obtenue par assemblage des deux cadres, le petit côté 36 d'un cadre comportant la rainure 40 déborde vers l'extérieur au delà de l'autre petit côté 36 de l'autre cadre.

Chaque bague 14 est de forme générale cylindrique et comprend, à son extrémité tournée vers les cadres 32, une rainure diamétrale 44 de réception du petit côté 36 d'un cadre dans lequel est formée la rainure 40.

A son autre extrémité, chaque bague 14 comprend une cavité cylindrique 46 dont le fond est à distance du fond de la rainure 44, et qui communique avec cette rainure par un perçage 48 de faible diamètre (par exemple 2mm). La cavité 46 de chaque bague 14 est destinée à recevoir un "septum" ou disque 50 de matière élastomère comprenant un perçage axial très fin 52 auto-obturant, qui débouche dans le perçage 48 précité (figure 5).

Chaque bague 14 comprend également une rainure périphérique 54 de montage d'un joint torique d'étanchéité.

On notera que la bague supérieure 14 est prolongée vers le haut par une jupe cylindrique 56 permettant de recueillir quelques gouttes de liquide lors de la connexion et de la déconnexion de la cartouche d'extraction à des moyens d'amenée de produit ou de réactif, ce qui évite la pollution ou la contamination des surfaces environnantes.

Enfin, on peut prévoir deux pièces complémentaires 58 de forme semi-cylindrique, qui peuvent être des pièces pleines réalisées en une matière plastique appropriée et qui comprennent des passages traversants 60. Ces pièces 58 sont destinées à être disposées de part et d'autre des cadres 32 de la cartouche d'extraction à

l'intérieur d'un tube 10, pour réduire le volume interne libre de ce tube et réduire en conséquence le volume de liquide de dialyse qu'il faut amener à l'intérieur du tube pour le remplir.

5 La cartouche représentée dans les figures 2 à 5 est utilisée de la façon suivante :

lorsqu'elle est montée à étanchéité dans un tube cylindrique 10, comme représenté schématiquement en figure 1, une aiguille d'injection est enfoncée dans le  
10 perçage 52 du disque 50 ou "septum" de la bague supérieure, pour l'amenée d'un échantillon, d'un réactif ou d'un liquide de rinçage dans l'enceinte formée par les membranes 16 fixées sur les cadres 32. Le produit injecté  
15 supérieure 14, par la rainure 40 du côté transversal supérieur d'un cadre 42, et remplit l'enceinte de dialyse en traversant le filtre 20. Pour extraire ce produit, il suffit d'enfoncer une aiguille d'injection dans le perçage 52 du disque 50 ou septum de la bague inférieure 14  
20 et d'aspirer le produit contenu dans l'enceinte de dialyse.

Pour l'extraction d'ADN génomique à partir d'un échantillon de sang, on procède de la façon suivante, comme représenté schématiquement en figure 6 :

25 on réalise tout d'abord un rinçage de la cartouche par injection puis extraction de 10ml de PBS. On introduit ensuite dans la cartouche un échantillon de 10ml de sang mélangé à 10ml d'un produit de lyse des cellules, par exemple un mélange de sucrose et de triton  
30 comme décrit dans l'article précité de la Revue "Nucleic Acids Research" et on laisse incuber pendant 1h30 à 4°C. On extrait ensuite ce mélange de la cartouche, les noyaux des cellules restant accrochés sur le filtre 20. On effectue ensuite un double rinçage par du PBS (deux fois  
35 10ml) puis on injecte dans la cartouche 1,5 ml d'un pro-

10

duit de lyse des noyaux et 0,5 ml de protéinase K. L'incubation dans la cartouche est d'une heure à 55 °C.

On effectue ensuite une dialyse pendant quelques heures à 60°C environ par amenée d'un liquide de dialyse dans le tube 10 à l'extérieur de l'enceinte de dialyse délimitée par les membranes 16 de la cartouche, afin de purifier l'ADN présent dans cette enceinte et d'éliminer tous les déchets, puis on extrait l'ADN par soufflage et/ou aspiration dans l'enceinte de dialyse.

La température élevée de la dialyse permet de réduire beaucoup la durée de cette opération, qui serait d'une vingtaine d'heures à la température ambiante.

L'ADN peut également être extrait de cellules en culture ou de tissus préalablement dilacérés et homogénéisés. Dans tous les cas, il est avantageux de retenir et de fixer les noyaux sur le filtre 20 de la cartouche, pour ensuite effectuer des rinçages successifs à l'aide de tampons appropriés permettant notamment d'éliminer des lipides, des ribosomes encore attachés aux noyaux, des protéines nucléaires, y compris une partie des histones.

On peut par exemple rincer d'abord le filtre avec une solution contenant du Triton x-100 à 1%. Les produits sanguins restants sont alors bien détachés du filtre et les noyaux sont complètement délivrés de leur membrane lipidique externe. Une partie des histones est également extraite.

En rinçant ensuite à haute force ionique (2M NaCl) on enlève des noyaux la plupart de leurs ARNs restants, ainsi que certaines protéines.

On procède ensuite, comme précédemment décrit, à l'injection dans la cartouche d'un produit de lyse des noyaux et de 0,5 ml de protéinase K, puis on purifie par dialyse l'ADN restant. Les rinçages décrits ci-dessus permettant d'obtenir de l'ADN de plus grande pureté pour certains types de cellules.

L'invention est également applicable à l'extraction et à la purification des ARNs, par dégradation et élimination des ADN. Comme les ARNs, on est conduit à utiliser des membranes de dialyse à pores plus  
5 petits, ce qui rend la dialyse moins efficace et la purification moins bonne. La dégradation de l'ADN peut se faire de façon enzymatique par utilisation de DNases à la place de RNases, ou par action mécanique (par cisaillement par exemple par ultra-sons).

REVENDICATIONS

1. Cartouche pour la préparation d'acides nucléiques purifiés à partir de cellules, comprenant une enceinte de dialyse (18) destinée en particulier à la purification des acides nucléiques et des moyens (24, 26) d'entrée et de sortie de produits dans l'enceinte de dialyse, caractérisée en ce qu'elle comprend un support plan allongé (32) de faible épaisseur, à lumière centrale (38), sur les deux faces duquel sont fixées des membranes de dialyse (16) définissant entre elles l'enceinte de dialyse (18), et deux bagues d'extrémité (14) qui sont montées aux extrémités longitudinales opposées dudit support et comprennent chacune un conduit traversant (48) qui débouche dans l'enceinte de dialyse.

2. Cartouche selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle comprend un filtre (20) de rétention des noyaux des cellules, porté par le support et partageant l'enceinte de dialyse (18) en deux compartiments (22, 24) séparés dans lesquels les conduits traversants (48) desdites bagues débouchent d'un côté et de l'autre du filtre (20) respectivement.

3. Cartouche selon la revendication 2, caractérisée en ce que le filtre (20) est un film de polyester à mailles très fines ayant des dimensions de l'ordre du micromètre.

4. Cartouche selon l'une des revendications précédentes, caractérisée en ce que ledit support est formé de deux cadres rectangulaires (32) superposés, chaque cadre comportant sur la face interne d'un de ses petits côtés (36) une rainure (40) sensiblement axiale débouchant à ses extrémités dans l'enceinte de dialyse (18) et dans le conduit traversant (48) de la bague correspondante.

5. Cartouche selon la revendication 4, caractérisée en ce que les cadres rectangulaires (32) et les

bagues d'extrémité (14) sont en une matière synthétique ou composite à base de fibre de verre.

5 6. Cartouche selon la revendication 4 ou 5, caractérisée en ce que les bords internes de chaque cadre (32) sont chanfreinés du côté de la face extérieure du cadre sur laquelle est fixée une membrane de dialyse (16).

10 7. Cartouche selon l'ensemble de la revendication 2 et de l'une des revendications 4 à 6, caractérisée en ce que le filtre (20) est fixé entre les deux cadres (32) superposés.

15 8. Cartouche selon l'une des revendications 4 à 7, caractérisée en ce que chaque bague (14) comprend, sur une de ses faces d'extrémité, une rainure transversale (44) destinée à recevoir un petit côté d'un cadre précité (32) et dans laquelle le conduit traversant (48) de la bague débouche en regard de la rainure axiale (40) formée dans ce petit côté du cadre.

20 9. Cartouche selon la revendication 8, caractérisée en ce que chaque bague (14) comprend à son extrémité opposée une cavité cylindrique (46) de réception d'un disque de matière élastomère à perçage axial de faible diamètre auto-obturant, et en ce que le conduit traversant (48) de la bague est formé à travers le fond  
25 de cette cavité.

10. Cartouche selon l'une des revendications précédentes, caractérisée en ce que chaque bague (14) comporte un joint annulaire périphérique d'étanchéité.

30 11. Dispositif pour la préparation d'acides nucléiques purifiés à partir de cellules au moyen d'une cartouche (12) selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il comprend au moins un tube (10) dans lequel ladite cartouche est montée à étanchéité par ses bagues d'extrémité, des moyens (28, 30) d'amenée  
35 ou de circulation d'un liquide de dialyse dans le tube à l'extérieur de la cartouche, des moyens de liaison re-

liant les conduits traversants des bagues d'extrémité sélectivement à des moyens d'extraction par soufflage et/ou aspiration et à des moyens d'amenée d'échantillon à traiter, de réactifs et de produits de rinçage.

5           12. Dispositif selon la revendication 11, caractérisé en ce que ladite cartouche est disposée dans le tube entre deux pièces (58) semi-cylindriques permettant de réduire le volume interne libre du tube et comportant des conduits (60) de passage de liquide de dialyse.

10           13. Procédé de préparation d'acides nucléiques purifiés à partir de cellules, par lyse des noyaux des cellules, dégradation des protéines et purification des acides nucléiques par dialyse, caractérisé en ce qu'il comprend essentiellement :

15           - une étape de séparation et de fixation des noyaux sur un filtre placé dans une enceinte de dialyse,

            - une étape de lyse in situ des noyaux fixés sur le filtre, incluant une dégradation des protéines et des acides nucléiques indésirables,

20           - et une étape finale de dialyse in situ pour éliminer de ladite enceinte les constituants autres que les acides nucléiques recherchés.

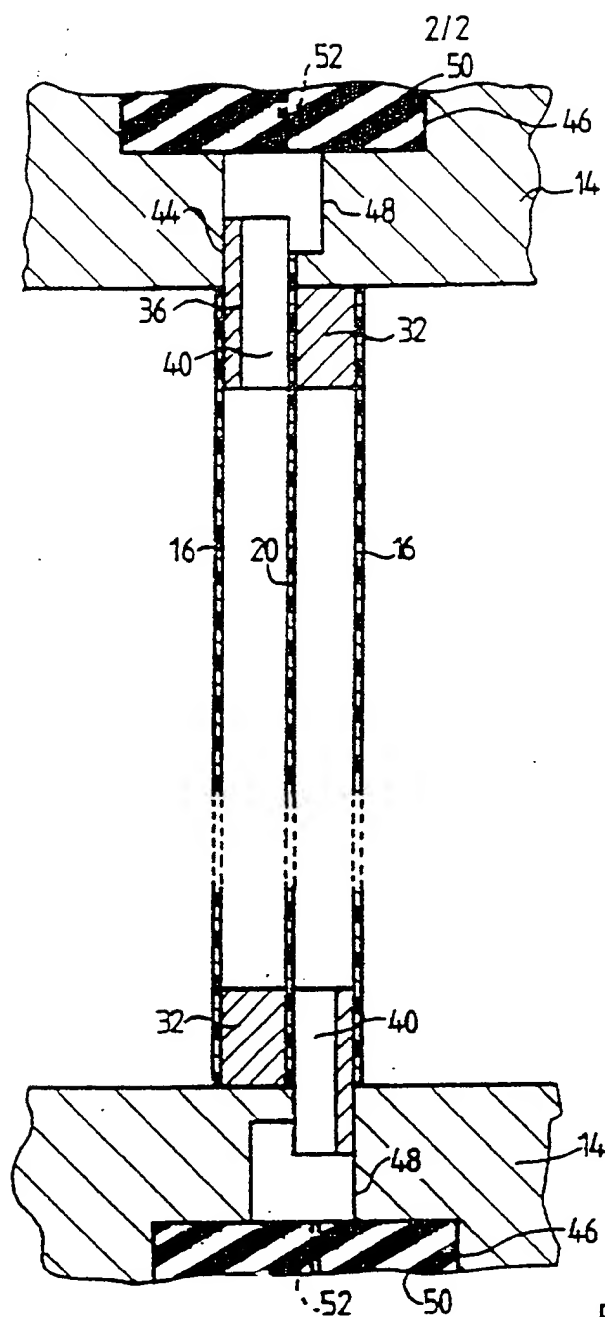
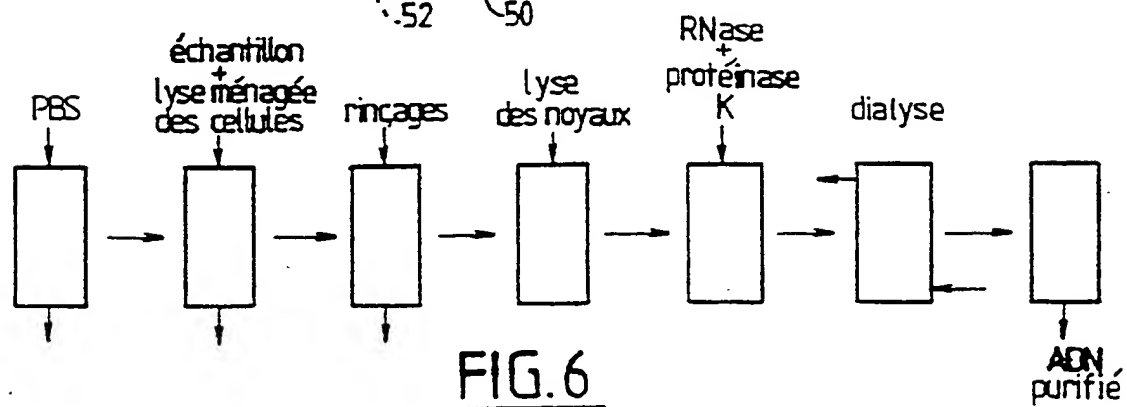
25           14. Procédé selon la revendication 13, caractérisé en ce qu'il comporte une étape préalable de lyse in situ des cellules dans l'enceinte de dialyse.

30           15. Procédé selon la revendication 13 ou 14, caractérisé en ce qu'il comporte des étapes successives de rinçage des noyaux fixés sur le filtre par des tampons appropriés pour en éliminer des composants tels que des lipides, des ribosomes restés attachés aux noyaux ou des molécules internes aux noyaux autres que les acides nucléiques recherchés.

35           16. Procédé selon l'une des revendications 13 à 15, caractérisée en ce que l'étape finale de dialyse est réalisée à température élevée, de l'ordre de 60°C par exemple.





FIG. 5FIG. 6

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/FR 92/00646

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.<sup>5</sup> C 12 Q 1/68; G 01 N 1/34; C 12 N 15/10

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.<sup>5</sup> C 12 N; G 01 N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO, A, 9 015 148 (UHLEN M. ET AL.) 13 December 1990 see the whole document	1,13
A	EP, A, 0 245 945 (APPLIED BIOSYSTEMS; INC.) 19 November 1987 see page 4, line 29 - page 6, line 27 see page 18, line 6 - page 20, line 11; claims	1,13
A	DE, A, 2 039 050 (ERNST SCHÜTT JUN.) 10 February 1972 see the whole document	1
A	EP, A, 0 431 905 (TOSOH CORPORATION) 12 June 1991 see the whole document	13
-/-		

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

## \* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

19 November 1992 (19.11.92)

Date of mailing of the international search report

2 December 1992 (02.12.92)

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

**ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
**ON INTERNATIONAL PATENT APPLICATION NO. FR 9200646**  
**SA 62262**

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report.  
 The members are as contained in the European Patent Office EDP file on  
 The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information. 19/11/92

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A-9015148	13-12-90	EP-A- 0432162	19-06-91
EP-A-0245945	19-11-87	JP-A- 63022194	29-01-88
DE-A-2039050	10-02-72	None	
EP-A-0431905	12-06-91	JP-A- 3180182	06-08-91
US-A-4921952	01-05-90	None	

EPO FORM P0019

For more details about this annex : see Official Journal of the European Patent Office, No. 12/82

<b>I. CLASSEMENT DE L'INVENTION</b> (si plusieurs symboles de classification sont applicables, les indiquer tous) <sup>7</sup> Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB : CIB 5 C12Q1/68;                      G01N1/34;                      C12N15/10		
<b>II. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE</b> Documentation minimale consultée <sup>8</sup>		
Système de classification	Symboles de classification	
CIB 5	C12N ;                      G01N	
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où de tels documents font partie des domaines sur lesquels la recherche a porté <sup>9</sup>		
<b>III. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS</b> <sup>10</sup>		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec indication, si nécessaire, <sup>11</sup> des passages pertinents <sup>12</sup>	No. des revendications visées <sup>14</sup>
A	WO,A,9 015 148 (UHLEN M. ET AL.) 13 Décembre 1990 voir le document en entier	1,13
A	EP,A,0 245 945 (APPLIED BIOSYSTEMS, INC.) 19 Novembre 1987 voir page 4, ligne 29 - page 6, ligne 27 voir page 18, ligne 6 - page 20, ligne 11; revendications	1,13
A	DE,A,2 039 050 (ERNST SCHOTT JUN.) 10 Février 1972 voir le document en entier	1
A	EP,A,0 431 905 (TOSOH CORPORATION) 12 Juin 1991 voir le document en entier	13
-/-		
<p>* Catégories spéciales de documents cités:<sup>11</sup></p> <p>"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent</p> <p>"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date</p> <p>"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)</p> <p>"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens</p> <p>"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée</p> <p>"T" document ultérieur publié postérieurement à la date de dépôt international ou à la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention</p> <p>"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive</p> <p>"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette corrélation étant évidente pour une personne du métier.</p> <p>"A" document qui fait partie de la même famille de brevets</p>		
<b>IV. CERTIFICATION</b>		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée 19 NOVEMBRE 1992		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale 02.12.92
Administration chargée de la recherche internationale OFFICE EUROPEEN DES BREVETS		Signature du fonctionnaire autorisé LUZZATTO E.R.

ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE  
RELATIF A LA DEMANDE INTERNATIONALE NO.

FR 9200646  
SA 62262

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche internationale visé ci-dessus.  
Lesdits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du  
Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets. 19/11/92

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevets(s)	Date de publication
WO-A-9015148	13-12-90	EP-A- 0432162	19-06-91
EP-A-0245945	19-11-87	JP-A- 63022194	29-01-88
DE-A-2039050	10-02-72	Aucun	
EP-A-0431905	12-06-91	JP-A- 3180182	06-08-91
US-A-4921952	01-05-90	Aucun	

EPO FORM P002

Pour tout renseignement concernant cette annexe : voir Journal Officiel de l'Office européen des brevets, No.12/82